TEMA 2.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

1. Técnicas de diagnóstico molecular
2. Tratamiento de enfermedades

1. Técnicas de diagnóstico molecular

- **Test Químicos:** Pruebas Bioquímicas
  Ej.: Fenilalanina → Fenilcetonuria; Ácido Úrico → Lesch-Nyhan;

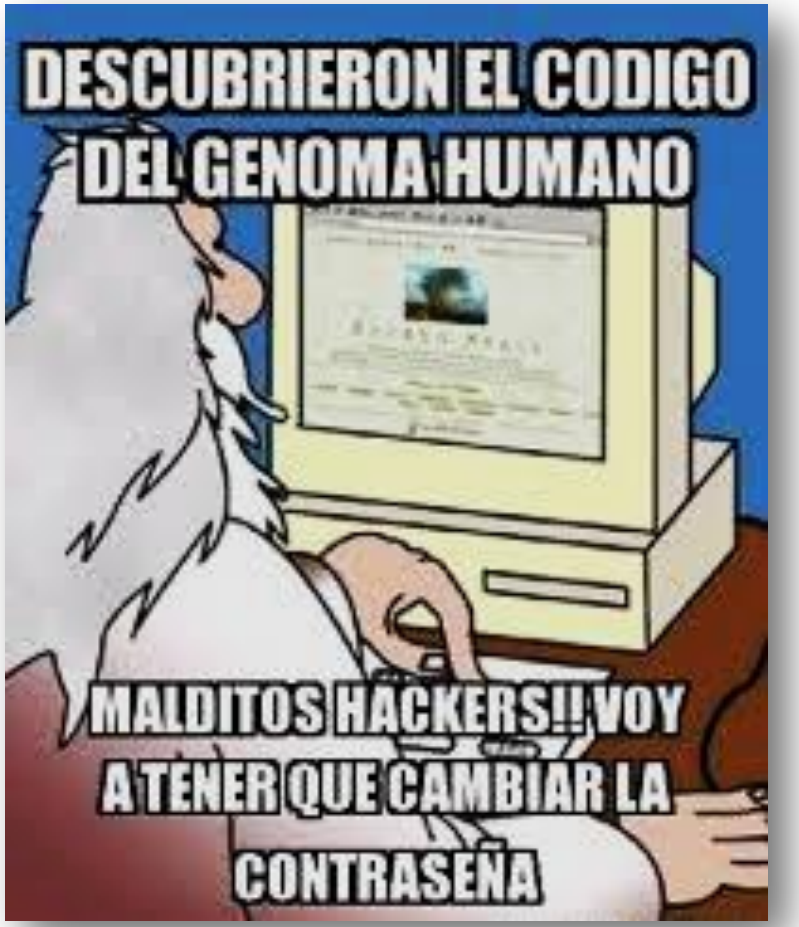
- **Técnicas Cromatográficas:** Papel, Capa fina, Intercambio iónico, Líquida y Gaseosa
- **Cromatografía combinada con espectrometría de masas**
- **Electroforesis:** Análisis de proteínas anormales
- **Técnicas inmunohistoquímicas:** Estudio en tejidos, biopsias
- **Células en cultivo**
- **Técnicas de Biología Molecular:**
  - Diagnóstico de enfermedades genéticas → Identificar gen y mutación responsable de la enfermedad.
  - Diagnóstico de enfermedades infecciosas → bacterianas y víricas.
  - Diagnóstico de enfermedades tumorales.
  - Medicina Forense → Análisis de paternidad. Identificación de cadáveres. Identificación de personas.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES

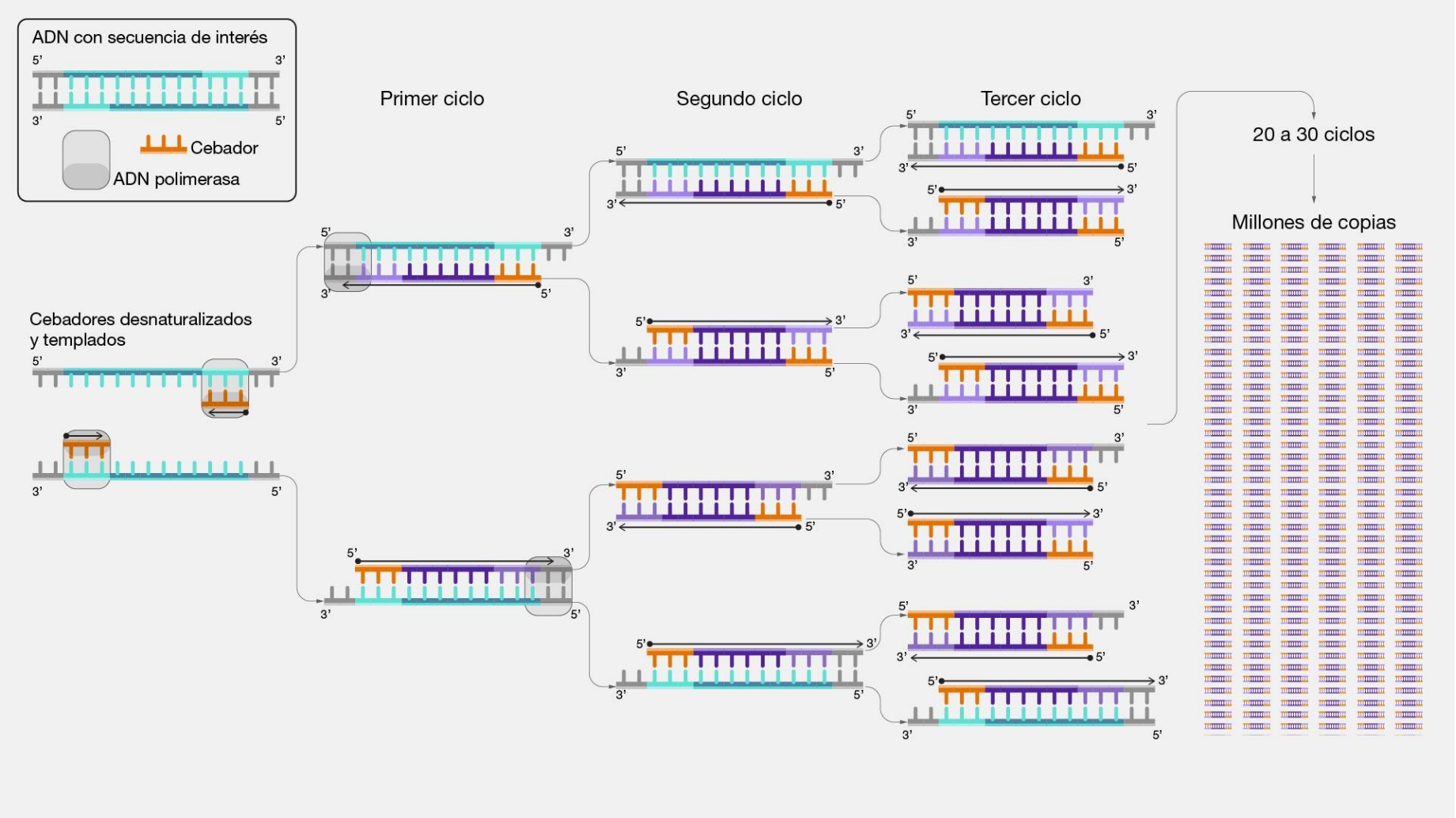
Estas técnicas son posibles gracias a los avances en Biología Molecular y a la secuenciación del genoma humano

- Análisis DNA (Lab. Bioquímica y/o lab. Genética)
- Directo o Indirecto:
  - **Directo →** Identificación de la presencia del alelo alterado
    - ✓ Técnicas básicas en Biología Molecular (ej. Aislamiento de DNA/RNA, Southern…)
    - ✓ Amplificación por PCR
    - ✓ Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)
    - ✓ etc.
  - **Indirecto →** Aproximaciones basadas en la co-segregación de marcadores genéticos.
    - ✓ Polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción
    - ✓ Polimorfismo de repetición (STRs, VNTRs…)
    - ✓ Análisis de SNPs

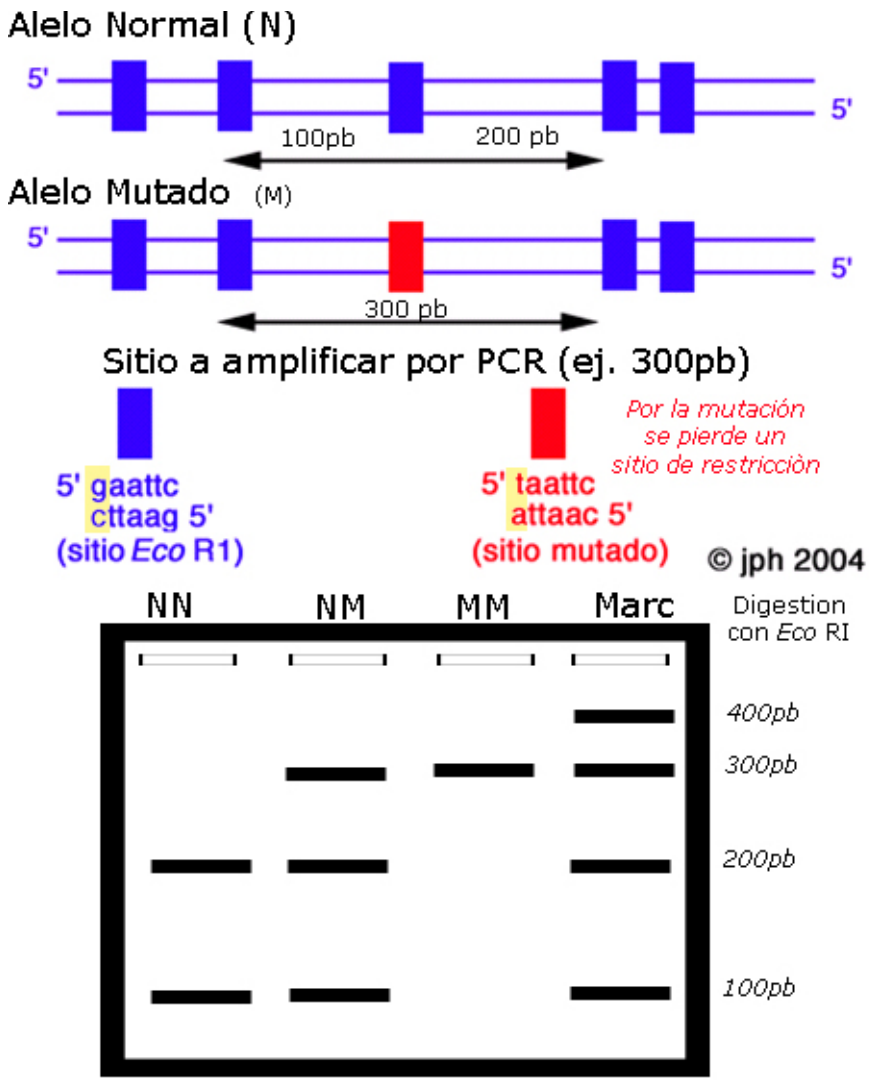
    → Identifica el haplotipo de una enfermedad: agrupación de variantes genómicas o polimórficas, no identifica mutaciones, pero es necesario estudiar un conjunto de individuos de varias generaciones.



PCR (*Polymerase chain reaction*)

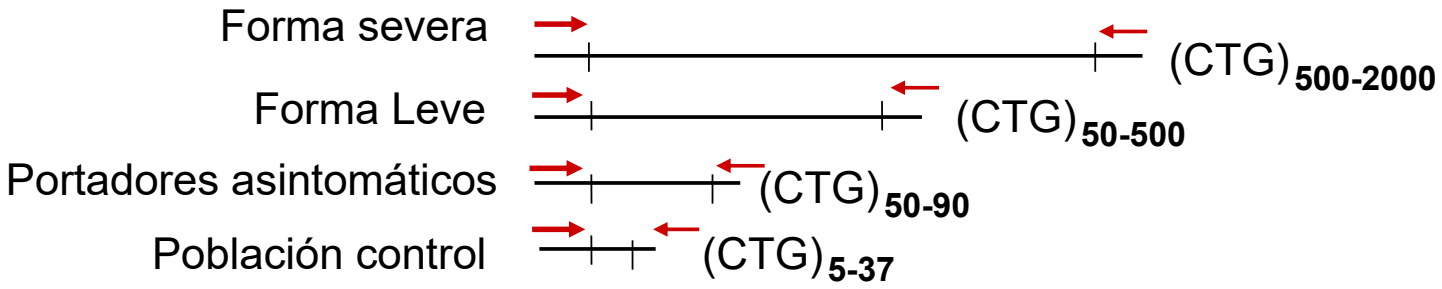


EJEMPLO DE APLICACIÓN: PCR-DIGESTIÓN

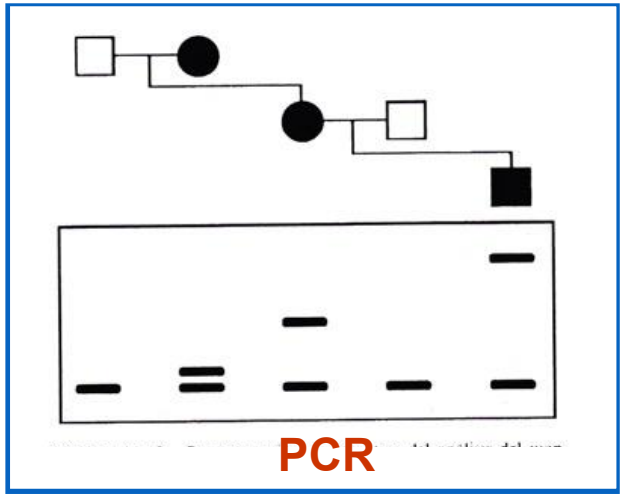


EJEMPLO DE APLICACIÓN: DISTROFIA MIOTÓNICA (DM)

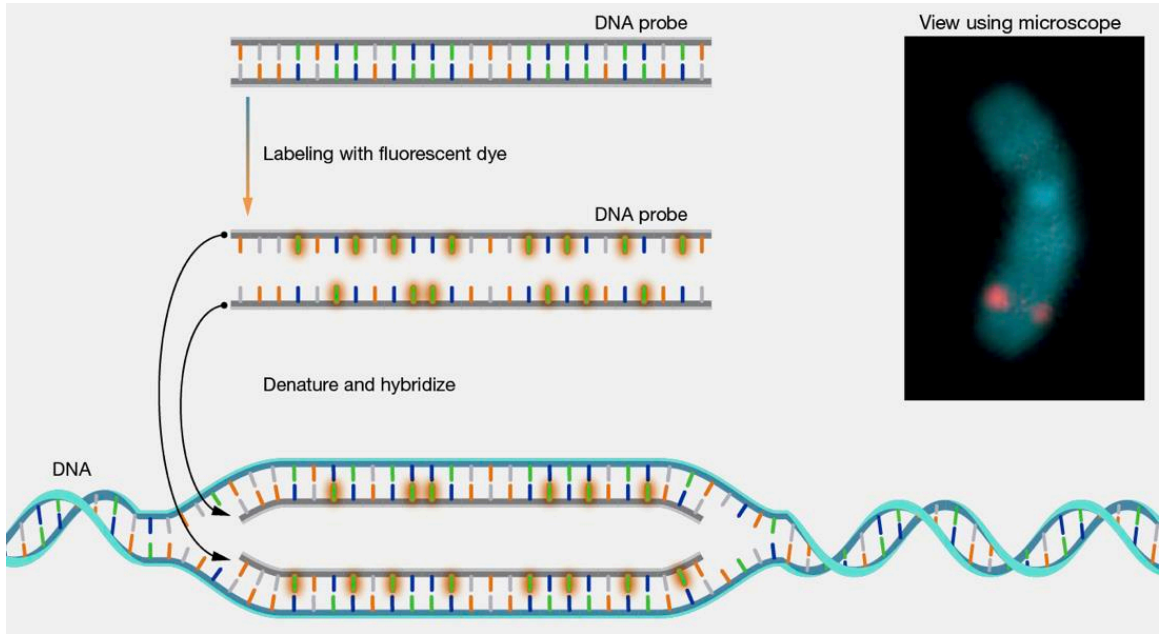
- Los síntomas aparecen en una edad juvenil o adulta, caracterizada por cataratas, miotonía y debilidad muscular generalizada y progresiva.
- La mutación causante de la DM es la expansión de una secuencia inestable de 3 nucleótidos, CTG, (STR), localizada en la región 3' no traducida de una quinasa DMPK (*Dystrophia Myotonic Protein Kinase*). Es una enfermedad autosómica dominante.



En un alto porcentaje de transmisiones, la expansión CTG aumenta de una generación a la siguiente.

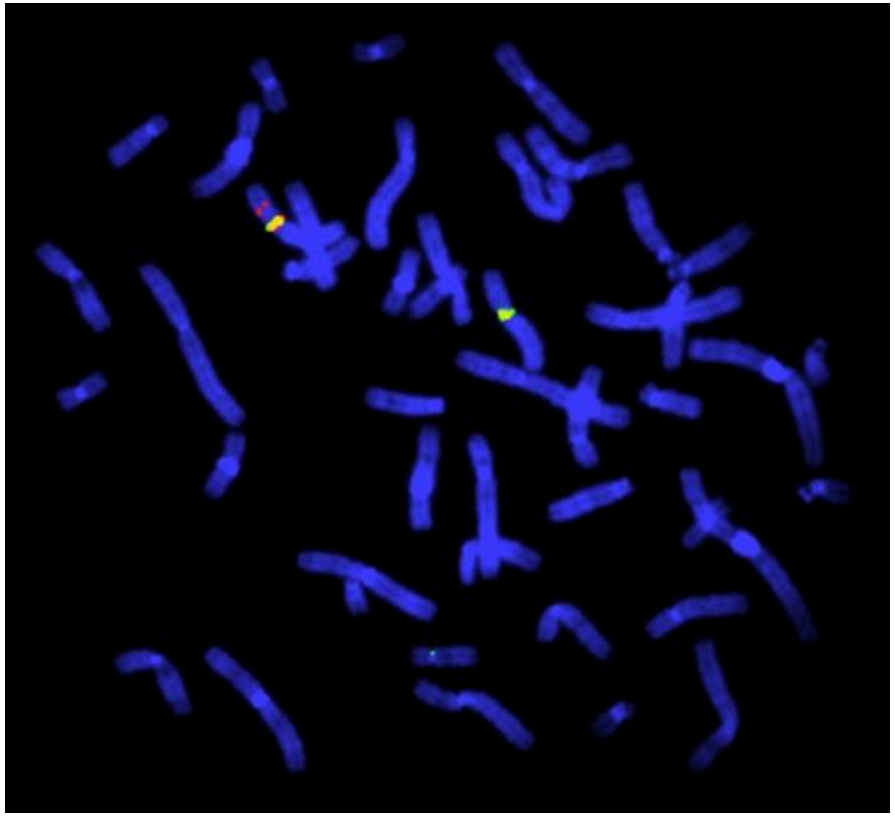


FISH (Hibridación *in situ* con fluorescencia)



- Prueba para detectar y localizar secuencias de ADN específicas en un cromosoma.
- Se visualizan anomalías genéticas específicas mediante el uso de sondas de ADN específicas que están unidas a un fluoróforo.
- Con el uso de un microscopio especial, se puede ver el cromosoma y la ubicación subcromosómica donde se unió la sonda fluorescente.

Un ejemplo…

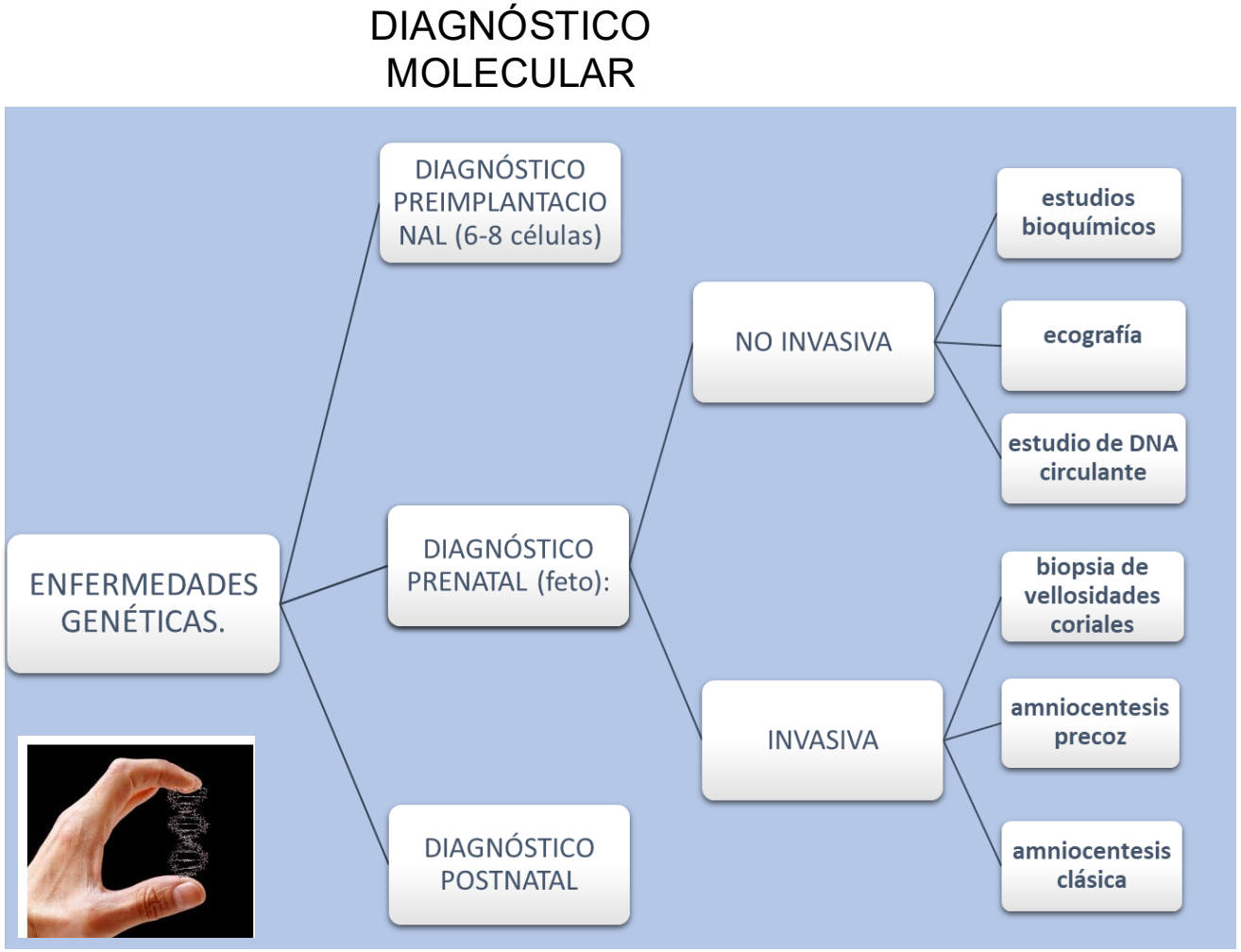


FISH study for deletion in the Duchenne muscular dystrophy gene.

The DMD cosmid probe is red, the X chromosome centromeres are green.

OBJETIVOS DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS GENÉTICO

- Diagnóstico molecular de la enfermedad
- Identificación de portadores
- Diagnóstico Prenatal (y consejo genético), y *screening* en neonatos
- Diagnóstico preimplantacional (en fecundación *in vitro*)
- *Screening* genético poblacional (población general y/o población de riesgo)
- Estudios forenses
- Desarrollo metodológico
- Investigación



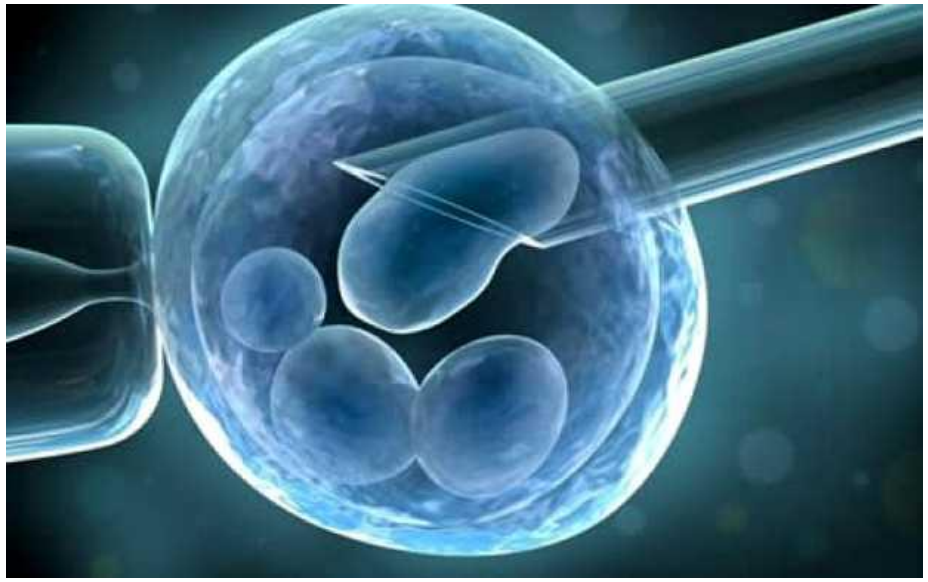
DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

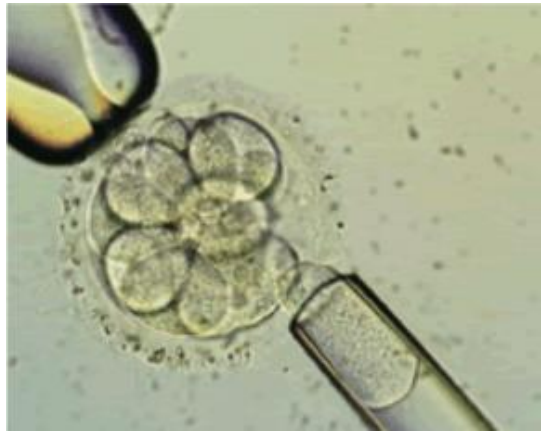
Selección de embriones libres de una enfermedad determinada.

Pasos:

- La mujer se somete a una estimulación ovárica para obtener el mayor número de óvulos posible.
- En el laboratorio se fecundan los óvulos con espermatozoides de la pareja.
- Se deja evolucionar el embrión hasta el estadio de 6-8 células (3º día) o bien hasta el 5º día (estadio de blastocito).
- Se realiza una biopsia de los embriones para hallar aquellos libres de una determinada enfermedad.
- Se transfieren al útero los embriones sanos
- Los embriones no transferidos se pueden congelar.

→ Anemia de Fanconi, Corea de Huntington, Fibrosis quística, Talasemia, Síndrome de Down, etc.





DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

DIAGNÓSTICO PRENATAL

Conjunto de pruebas diagnósticas que se llevan a cabo durante el embarazo para intentar identificar la presencia de posibles **defectos congénitos en el feto** o bien factores de riesgo maternos que pueden requerir controles estrictos a lo largo de la gestación.

Tipos de Diagnóstico Prenatal:

- **NO INVASIVO**
  - Estudios bioquímicos
  - Ecografía
  - Estudio de DNA circulante
- **INVASIVO**
  - Biopsia de vellosidades coriales
  - Amniocentesis precoz
  - Amniocentesis clásica

Principales indicaciones para el diagnóstico prenatal

Indicación	Riesgo de feto afectado con enfermedades cromosómicas (%)
Edad materna avanzada >35 años	1-10 dependiendo de la edad materna
Progenitor con una translocación equilibrada	3-20 según translocación
Hijo anterior con anomalía cromosómica	Aproximadamente 1

DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO

Ecografía

→ Es una prueba de diagnóstico por imágenes.

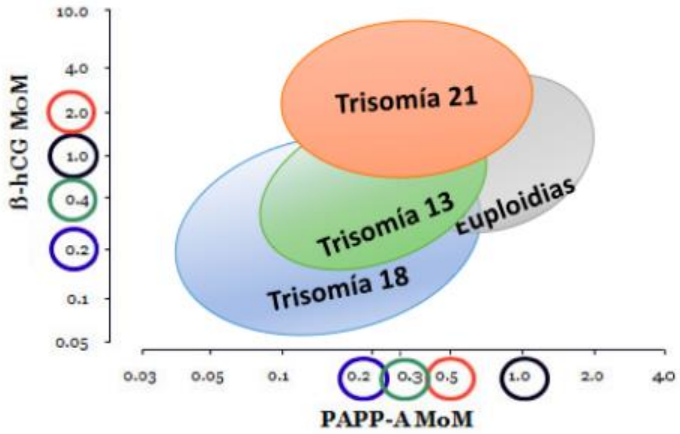
→ Utiliza ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de cómo se está desarrollando el bebé en el útero.

→ La ecografía es el método de exploración imprescindible en el ámbito del diagnóstico prenatal.

Analítica

→ Entre la semana 9 y 12, pueden cuantificarse dos proteínas del embarazo a partir de la sangre de la madre.

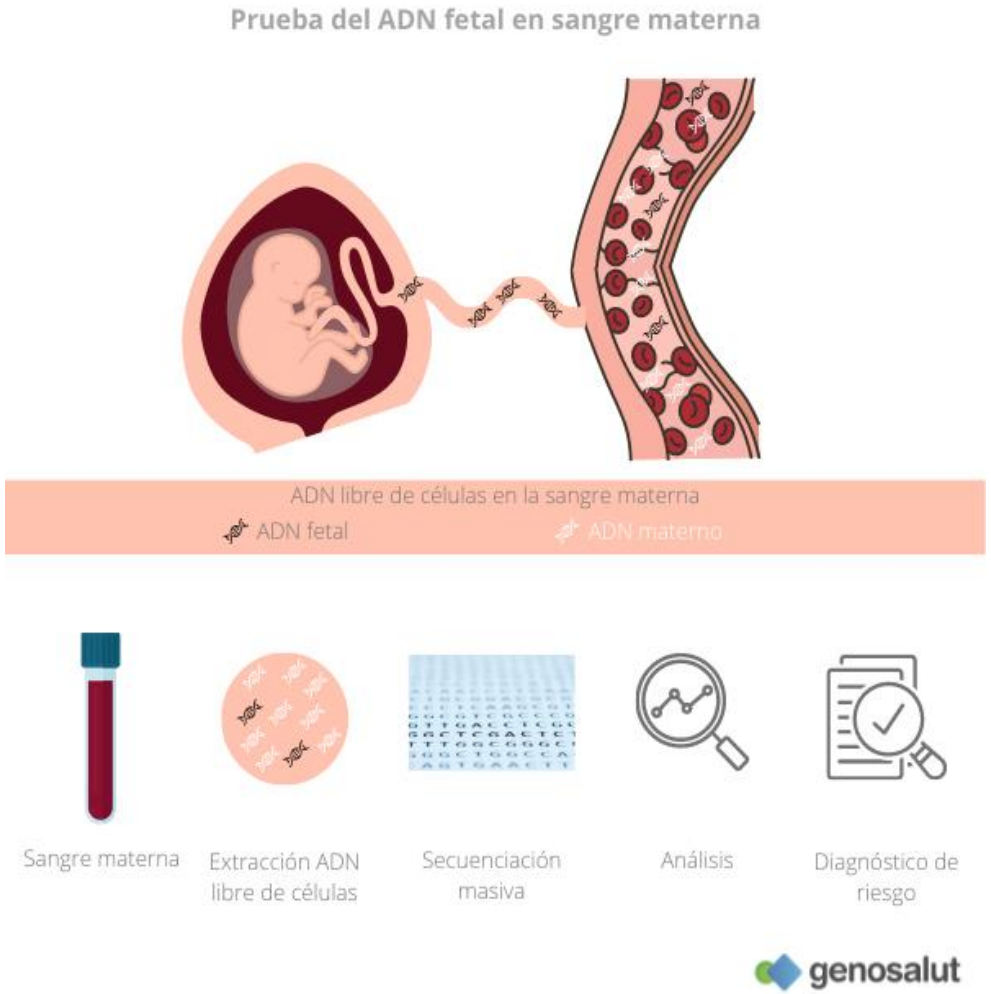
→ La **Beta-HCG** (hormona producida por la placenta) y la **PAPP-A** (sangre del feto), son proteínas plasmáticas asociada al embarazo, cuyo aumento o disminución están relacionados con la aparición de algunas enfermedades cromosómicas o congénitas.



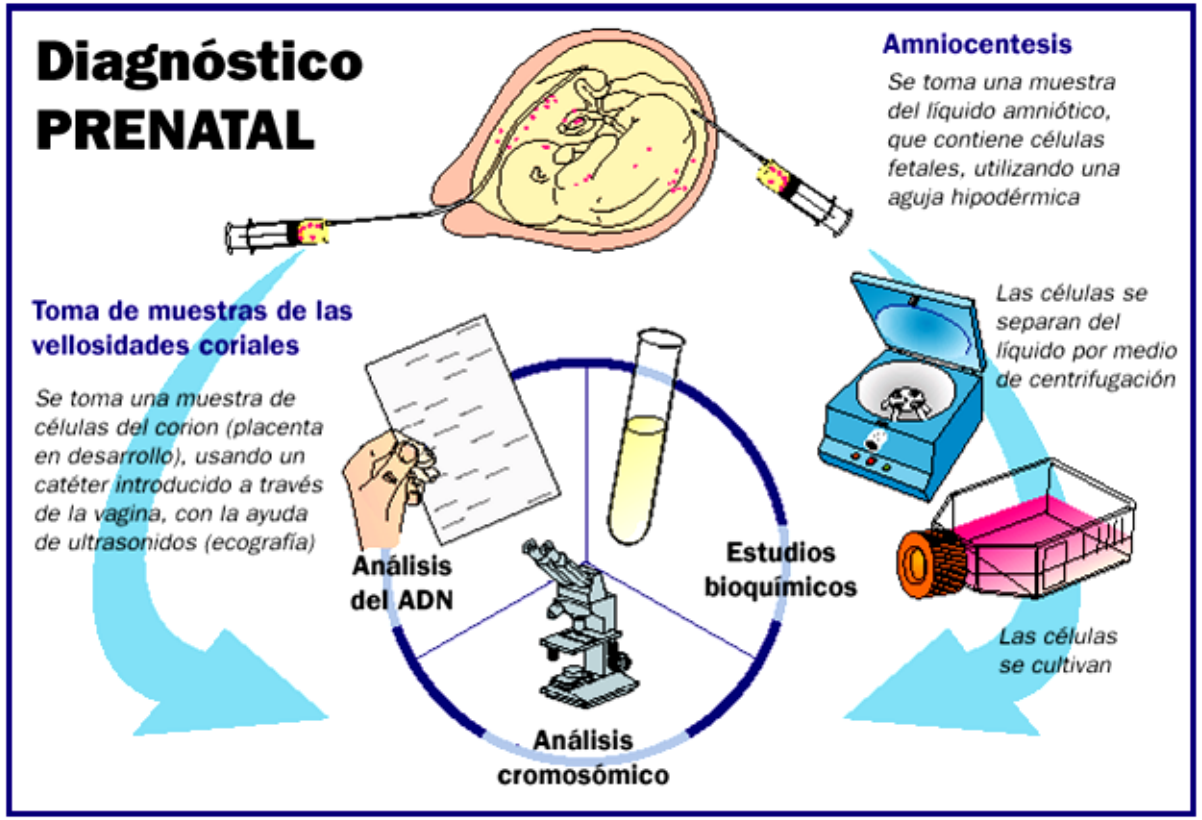
DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO

Test de DNA fetal en sangre materna

- Esta prueba analiza pequeños fragmentos de DNA fetal libre que circulan en la sangre de una mujer embarazada.
- Se realiza a partir de la semana 10, para conocer en una semana el riesgo de padecer el Síndrome de Down (la Trisomía 21), el Síndrome de Edwards (la Trisomía 18) y el Síndrome de Patau (la Trisomía 13).
- El DNA se analiza mediante tecnología de secuenciación masiva de nueva generación (NGS).



DIAGNÓSTICO PRENATAL INVASIVO



Método de diagnóstico	Realización	Seguridad de detección
Amniocentesis	Semana 16	99,50%
Biopsia coriónica	Semana 11-14	99,50%

DIAGNÓSTICO POSTNATAL

La prueba del talón

Se toma una muestra de sangre del talón del recién nacido entre el 2º- 5º día de vida una vez que ha tomado alimento.

- **Hipotiroidismo congénito**
- **Fenilcetonuria**
- **Hiperplasia suprarrenal congénita**
- **Drepanocitosis** (Enfermedad de células falciformes)
- **Fibrosis quística**
- **Errores congénitos del metabolismo de aminoácidos** (Jarabe de Arce; Tirosinemia tipo I)
- **Errores congénitos del metabolismo de ácidos grasos** (Deficiencia primaria de carnitina; Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, Deficiencia de 3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga)
- **Errores congénitos del metabolismo de ácidos orgánicos** (Acidemia glutárica tipo I; Aciduria 3-hidroxi-3-metil glutárica; Acidemia isovalérica;Deficiencia de β-cetotiolasa; Acidemias metil malónicas: Cbl A, B, C,D, Mut; Acidemia propiónica).

CONSEJO GENÉTICO

Proceso por el cual los **pacientes y/o sus familiares con riesgo de sufrir una enfermedad genética**, son informados de las consecuencias del mismo, de la probabilidad de desarrollarlo y trasmitirlo a su descendencia y las alternativas que hay para prevenirlo o tratarlo.

Indicaciones para el consejo genético

- **Antecedentes de nacimiento de un bebe con malformaciones**

- **Parejas con riesgo reproductivo conocido**
  - Cuando uno de los progenitores tiene una enfermedad genética y por lo tanto se corre el riesgo de que se repita (recurrencia) como hemofilia.
  - Parejas consanguíneas pariente próximos
  - Portador de alguna alteración cromosómica

- **Parejas con fracasos reproductivos**
  - Esterilidad
  - Abortos de repetición sin causas conocidas
  - Bebes muertos recién nacidos o que mueren en el periodo natal

Objetivos del tratamiento

- Restauración de la homeostasis
- Tendencia al equilibrio o estabilidad orgánica en la conservación de constantes biológicas

Éxito de un tratamiento:

- Diagnóstico precoz
- Intervención precoz al desarrollo de lesiones tisulares
- Conocimiento de alteraciones bioquímicas y fisiopatológicas

Enfoques terapéuticos:

- Fenotipo clínico
- Fenotipo metabólico
- Trasplante de órganos
- Bebes medicamento
- Terapia génica/celular (+ definitivos)

ENFOQUES TERAPÉUTICOS

FENOTIPO CLÍNICO

- **Educación al paciente** (evitar sol, fármacos, actividad física…..)
- **Farmacología:** Anticonvulsivos en enfermedades neurodegenerativas
- **Cirugía:** labio leporino (reconstrucción malformación facial)

FENOTIPO METABÓLICO

- **Alteración de metabolitos**
  - ➜ Restricción del sustrato: fenilcetonuria (fenilalanina), intolerancia a la lactosa (lactosa)
  - ➜ Inhibición metabólica: gota (alopurinol, inhibe la síntesis de ácido úrico)
- **Alteración proteica**
  - ➜ Activación de proteína mutante: enfermedad del jarabe de arce (Tiamina o vitamina B1, cofactor del enzima alfa-ceto decarboxilasa)
  - ➜ Reposición proteica: hormona del crecimiento, factores de coagulación

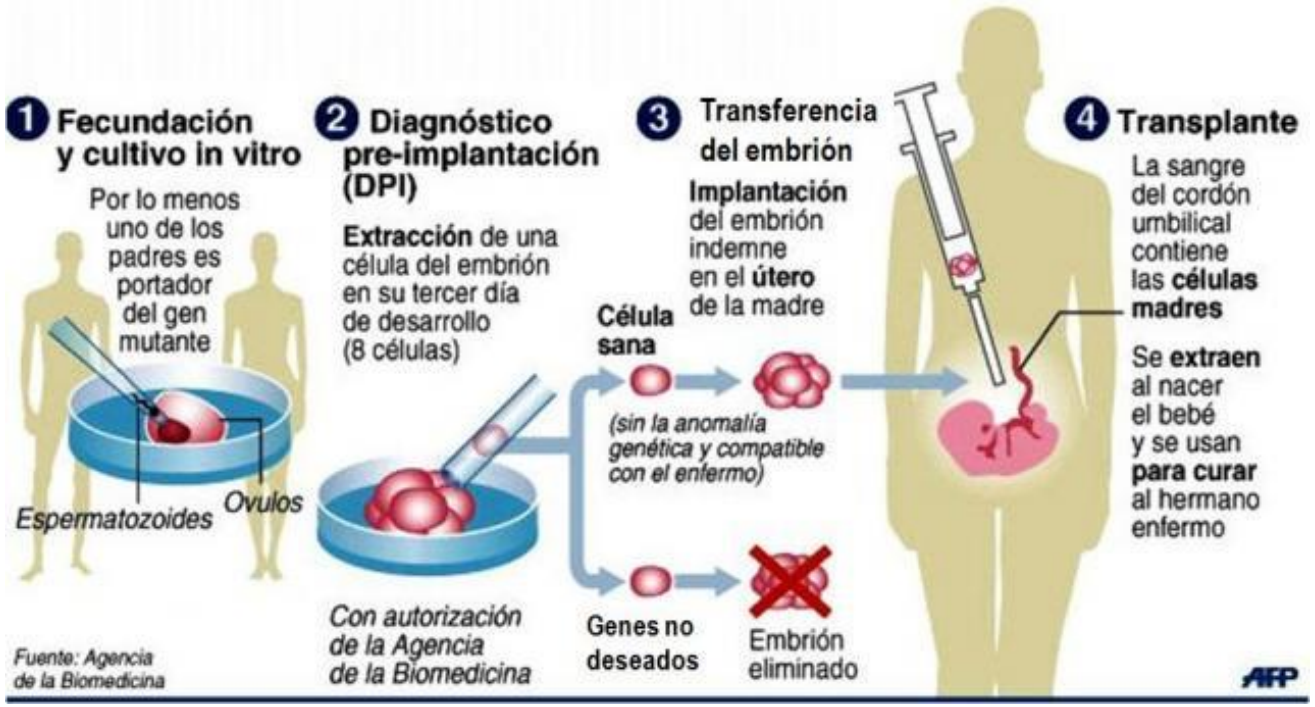
TRASPLANTE DE ÓRGANOS

- Como fuente de proteína específica: deficiencia de OTC (hígado)
- Como reposición de órganos

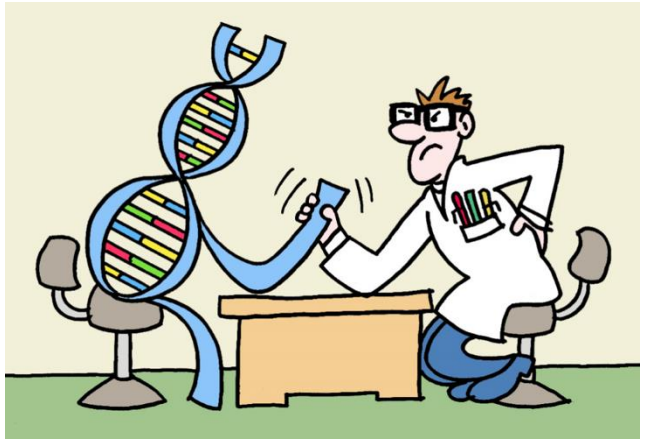
BEBÉS MEDICAMENTO

Sevilla 2012

Niño que ha nacido con técnicas de reproducción asistida para ser **genéticamente compatible** con su hermano enfermo, con el objetivo de proporcionarle un **trasplante** que no será rechazado y poder curarlo.



TERAPIA GÉNICA



Se define como terapia génica a cualquier procedimiento mediante el cual se modifiquen genéticamente las células de un paciente con el propósito de tratar o aliviar una enfermedad.

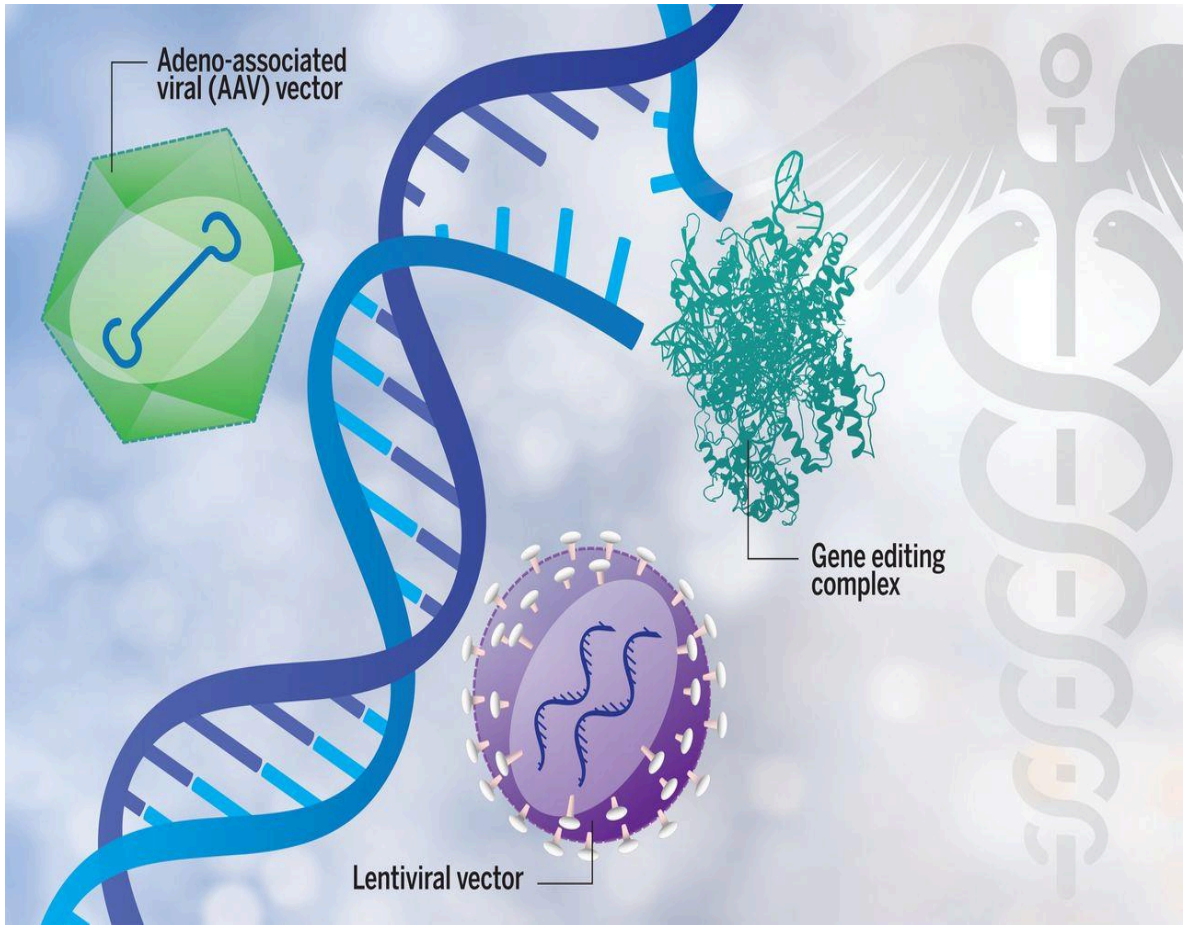
La terapia génica introduce un gen en células de un individuo para conseguir un efecto terapéutico o se corrige el gen alterado (edición génica).

El objetivo de la terapia génica es conseguir la **expresión suficiente y permanente en el tiempo del gen terapéutico o «transgén»** para mejorar los síntomas o curar una enfermedad.

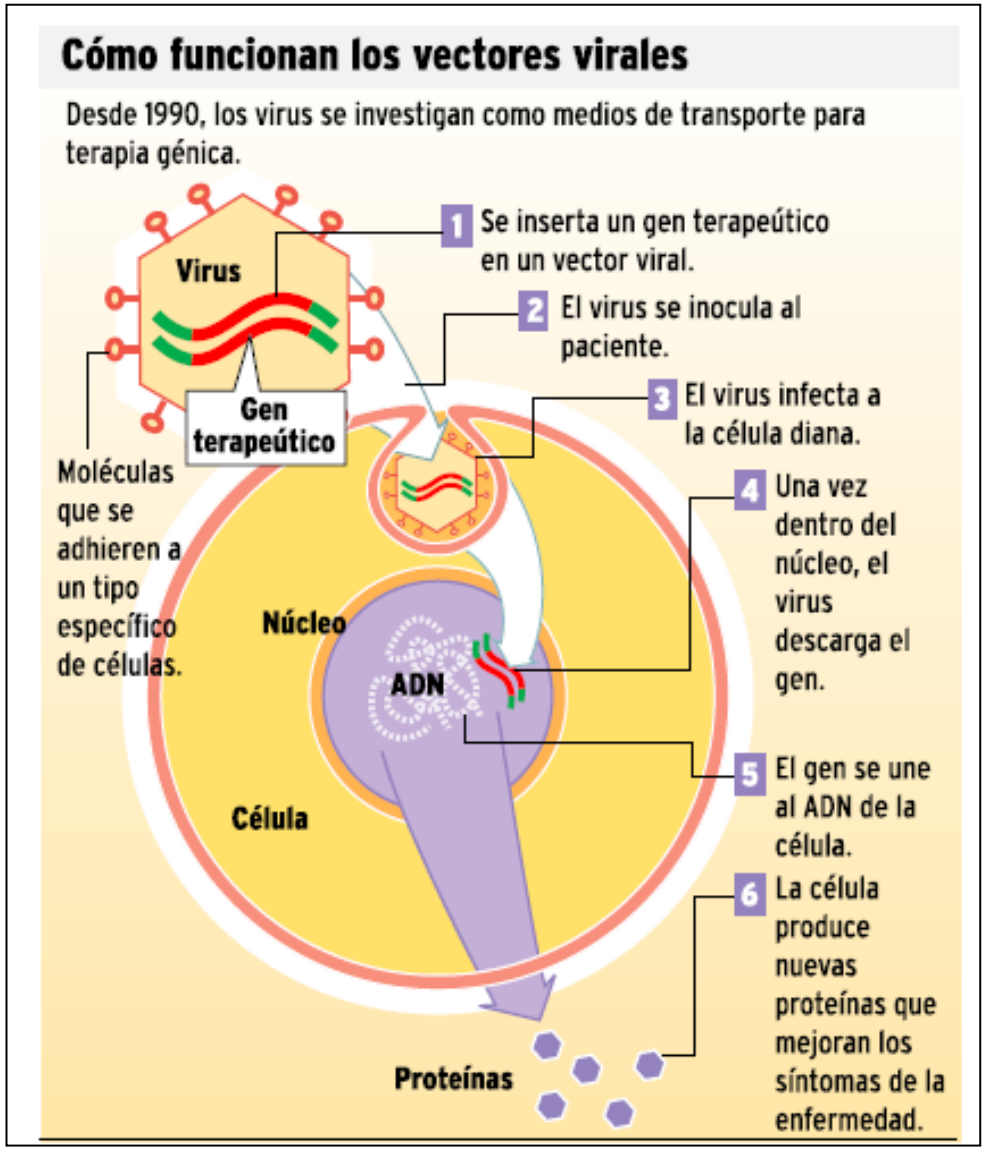
Un **vector**, habitualmente un **virus sin capacidad de replicarse** es el encargado de la **transducción**, es decir, de introducir el transgén en el interior de las células del paciente.

El 14 de septiembre de 1990, en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH) los doctores Anderson, Rosenberg y Culver introdujeron **células T tratadas por ingeniería genética**, en la vena del brazo de la niña Ashanti de Silva. De esta forma, la niña, de apenas cuatro años de edad, se convirtió en la primera paciente en recibir terapia génica.

TERAPIA GÉNICA



Los vectores adenoasociados (AAV) y lentivirales son la base de varias terapias génicas aprobadas recientemente. Las tecnologías de edición de genes están en su infancia clínica, pero se espera que desempeñen un papel cada vez mayor en el campo.

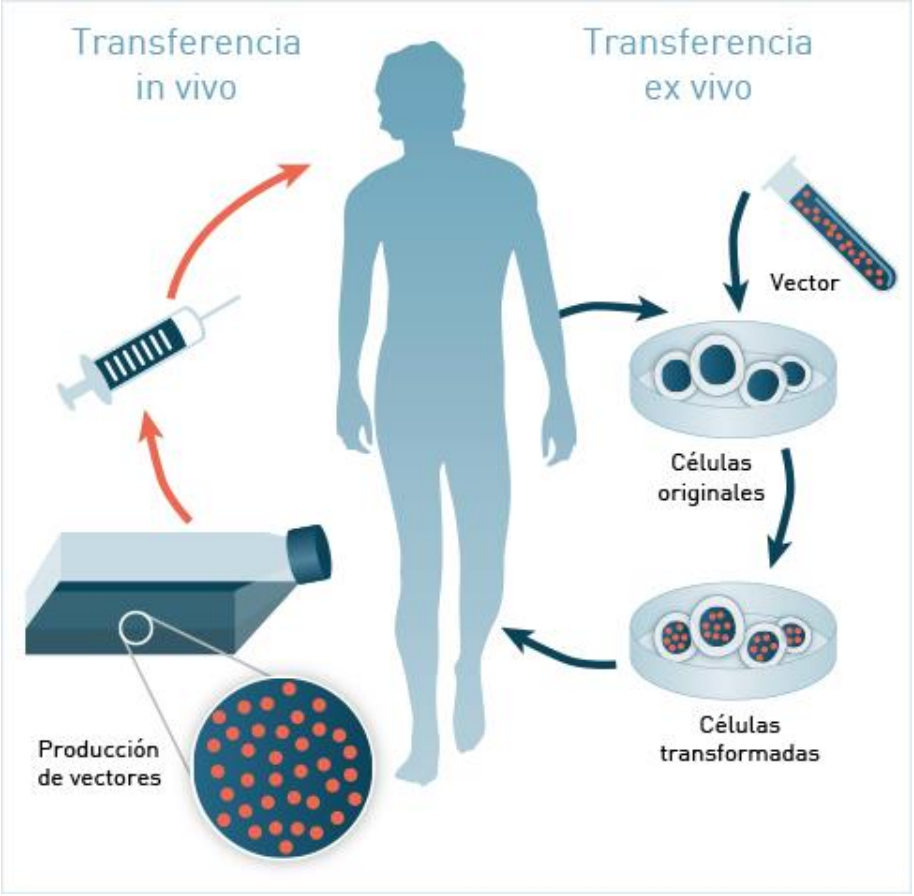


TERAPIA GÉNICA

Existen dos modalidades de tratamiento:

- Terapia génica ***ex vivo***: se extraen las células del paciente y se seleccionan las células precursoras o las células madre. El vector debe **integrar** el ácido desoxirribonucleico (**DNA**) en uno o varios *loci* cromosómicos de las células de forma que, cuando se devuelven al paciente, **transmiten** la nueva información genética a todas las **células hijas**. Esta técnica se utiliza en **células hematopoyéticas**.

- Terapia génica ***in vivo***: el vector con el transgén se administra directamente al paciente. Su objetivo son **células de vida larga o de división muy lenta** de forma que, una vez depositado el nuevo **gen**, este **se exprese durante toda la vida de la célula**. A diferencia de la modalidad *ex vivo*, no es necesaria la integración genética en el DNA de la célula. Se está usando para células de la **retina**, el **músculo esquelético** y el **hígado.**



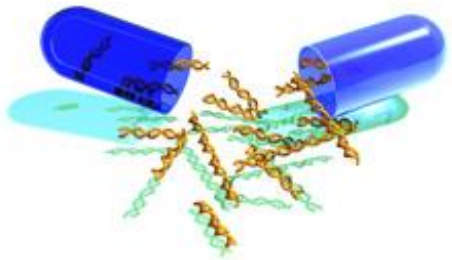
TERAPIA GÉNICA

En los últimos 6 años se han aprobado los primeros fármacos.

En el año 2016 la EMA autorizó un fármaco para el tratamiento de la **inmunodeficiencia combinada grave por deficiencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA)**, que introduce una copia funcional del gen de la ADA en el organismo del paciente. Esto supuso un hito en el tratamiento de las enfermedades monogénicas.

El año pasado se administró la primera terapia génica aprobada en España para tratar distrofias de retina.

Recientemente se han aprobado tratamientos para distintos tipos de cáncer, la hemofilia A, la distrofia muscular de Duchenne y la β-talasemia.



EL PAÍS

Ciencia / Materia

ASTROFÍSICA · MEDIO AMBIENTE · INVESTIGACIÓN MÉDICA · MATEMÁTICAS · PALEONTOLOGÍA · ÚL

HEMOFILIA >

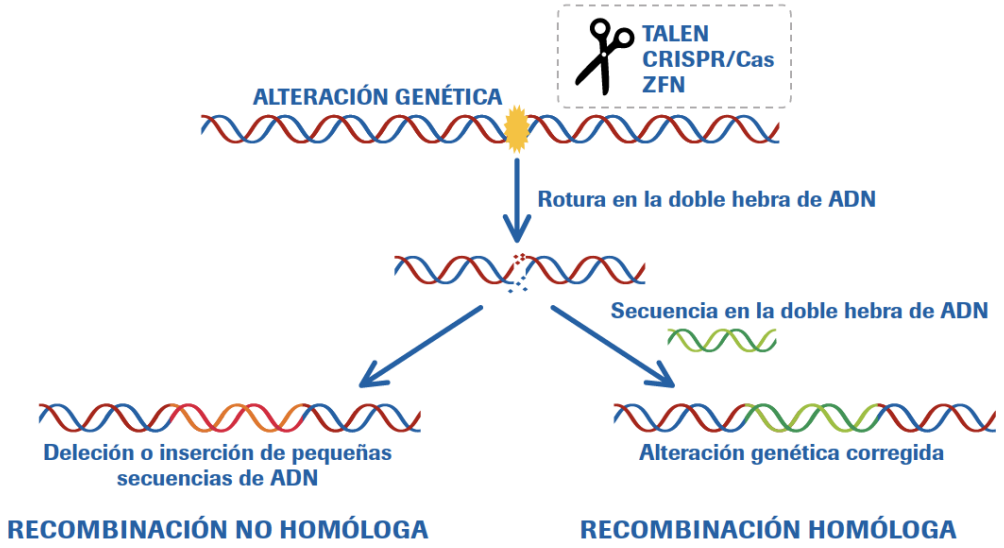
El medicamento más caro del mundo: un nuevo fármaco para terapia génica contra la hemofilia

El tratamiento con Hemgenix, recién aprobado por Estados Unidos, cuesta 3,5 millones de dólares

TERAPIA GÉNICA

CRISPR-Cas (y similares como ZFN, TALEN…)

- Edición del genoma celular.
- Técnica relativamente nueva (2012), aunque se describió en 2001.
- Fue premio nobel en 2020 (Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna).
- En 2016 se realizó el primer ensayo clínico en humanos (modificar el ADN de linfocitos de pacientes con cáncer de pulmón avanzado)

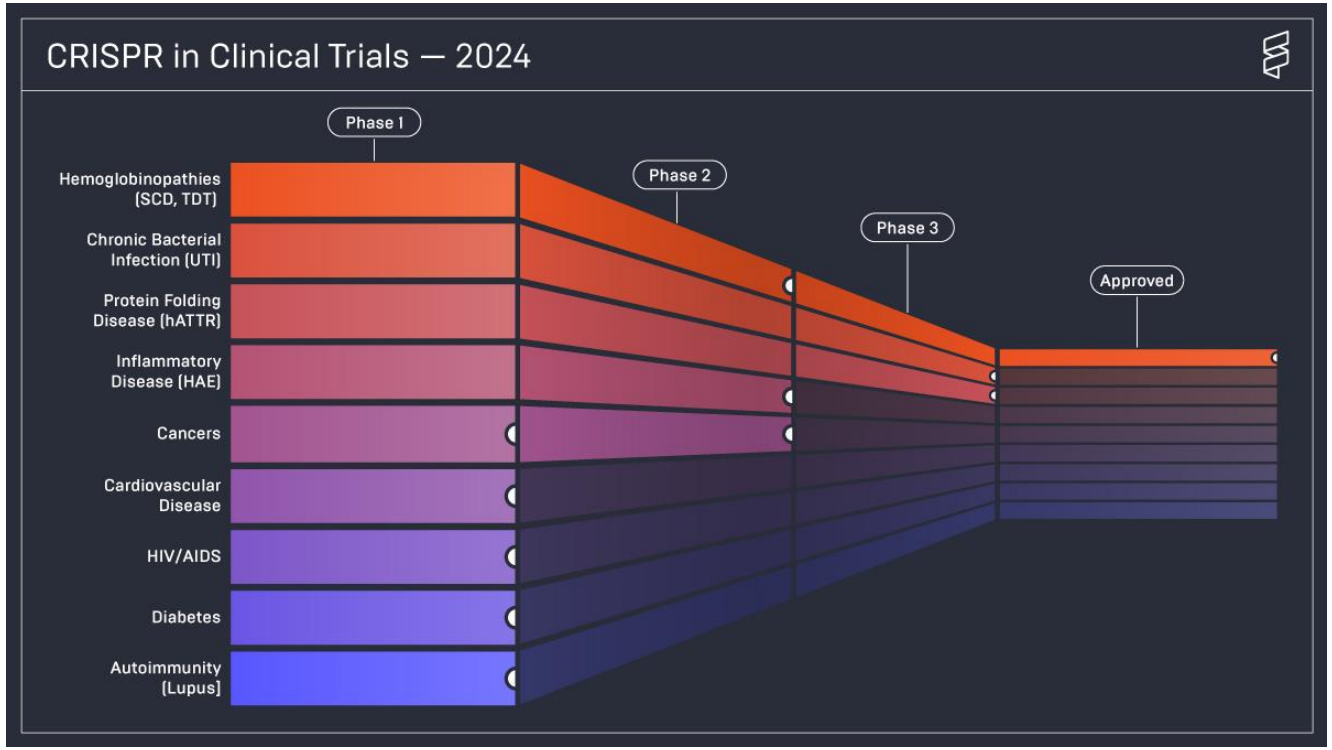


POTENCIAL DE LA EDICIÓN DEL GENOMA???

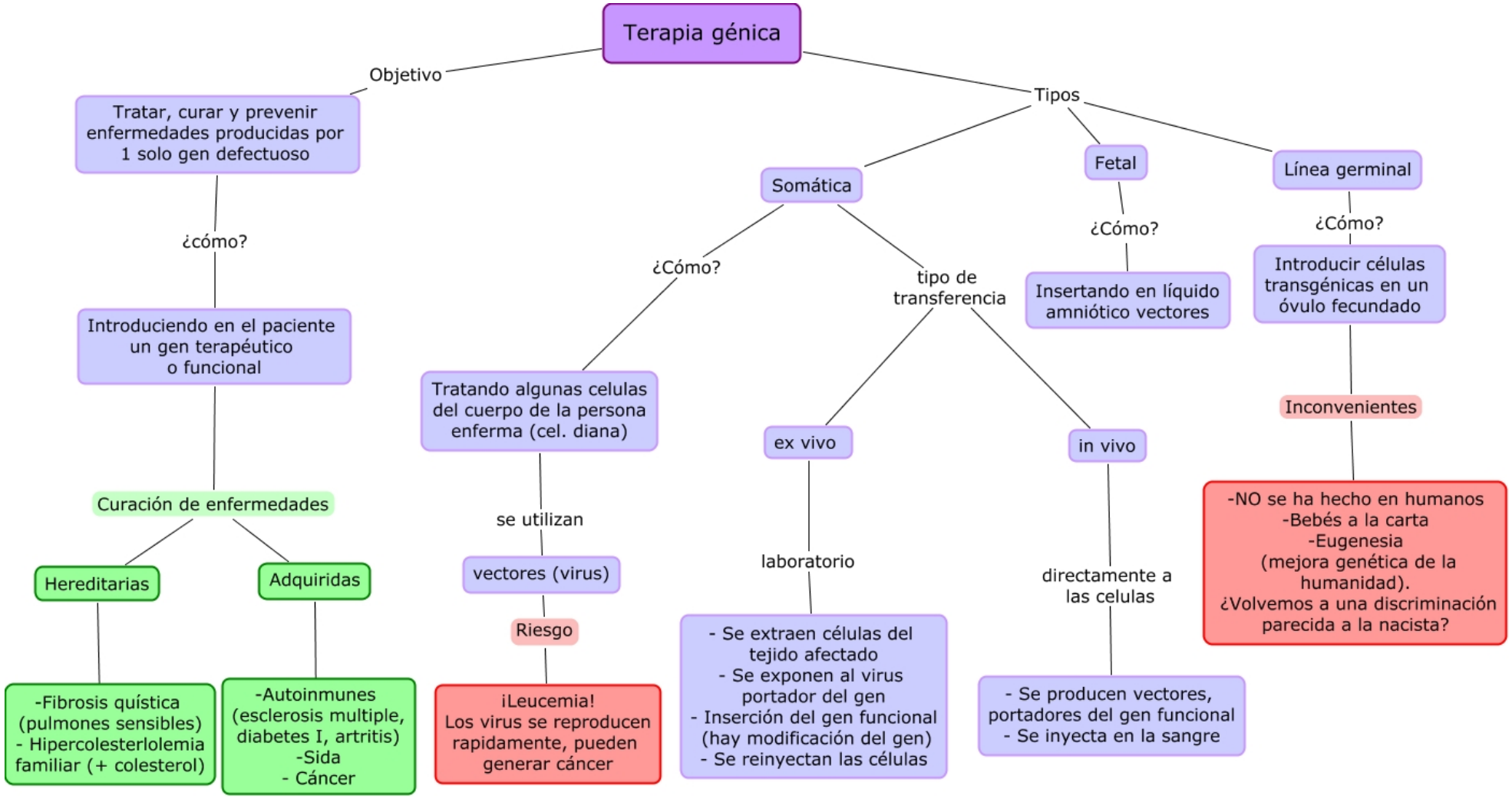
TERAPIA GÉNICA

CRISPR-Cas (y similares como ZFN, TALEN…)

- No se puede utilizar para seleccionar individuos.
- Uso aprobado para terapias génicas *ex vivo*.
- Primer medicamento aprobado por la EMA y comercializado en 2024 para el tratamiento de la beta talasemia y la drepanocitosis.
- Desde 2018, la AEMPS ha autorizado 4 ensayos clínicos en España con técnicas de edición genómica, 3 de ellos con CRISPR/Cas y uno con el sistema TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*/nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción).



SCD (*Skill cell disease*, anemia falciforme)
TDT (beta talasemia dependiente de transfusiones)


Terapia génica
Objetivo
Tratar, curar y prevenir enfermedades producidas por 1 solo gen defectuoso
¿cómo?
Introduciendo en el paciente un gen terapéutico o funcional
Curación de enfermedades
Hereditarias
Adquiridas
-Fibrosis quística (pulmones sensibles)
- Hipercolesterlolemia familiar (+ colesterol)
-Autoinmunes (esclerosis multiple, diabetes I, artritis)
-Sida
- Cáncer
Tipos
Somática
¿Cómo?
Tratando algunas celulas del cuerpo de la persona enferma (cel. diana)
se utilizan
vectores (virus)
Riesgo
¡Leucemia! Los virus se reproducen rapidamente, pueden generar cáncer
tipo de transferencia
ex vivo
laboratorio
- Se extraen células del tejido afectado
- Se exponen al virus portador del gen
- Inserción del gen funcional (hay modificación del gen)
- Se reinyectan las células
in vivo
directamente a las celulas
- Se producen vectores, portadores del gen funcional
- Se inyecta en la sangre
Fetal
¿Cómo?
Insertando en líquido amniótico vectores
Línea germinal
¿Cómo?
Introducir células transgénicas en un óvulo fecundado
Inconvenientes
-NO se ha hecho en humanos
-Bebés a la carta
-Eugenesia
(mejora genética de la humanidad).
¿Volvemos a una discriminación parecida a la nacista?

TERAPIA CELULAR

CÉLULAS MADRE: POTENCIAL TERAPÉUTICO

La terapia celular tiene como objetivo la sustitución de las células dañadas por otras nuevas.

Estos tratamientos celulares podemos considerarlos compuestos de dos fases:

1. Obtención de células específicas y compatibles con el individuo.

2. Introducción de las mismas (implante) en el tejido enfermo para restaurar la función pérdida por el organismo.

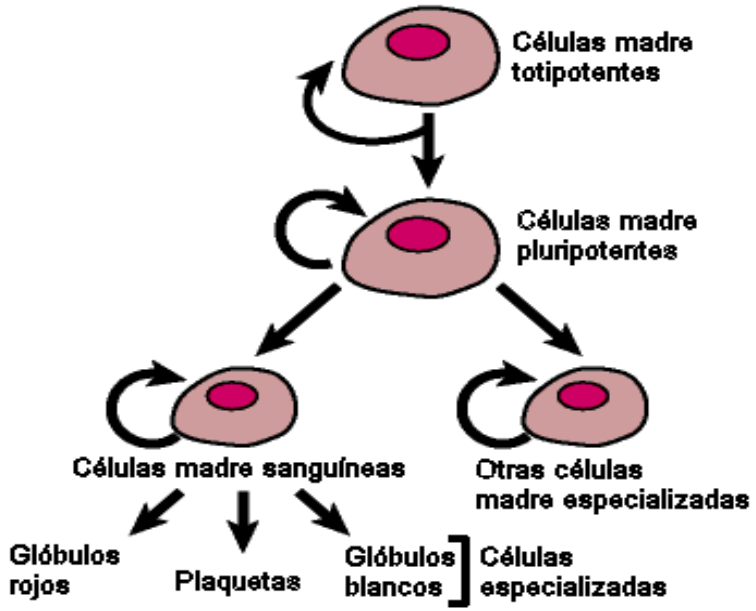
En este sentido, cobran una gran importancia las células madre (embrionarias, fetales y adultas) y su capacidad para desarrollarse en células de cualquier tipo de tejido.

TERAPIA CELULAR

CÉLULAS MADRE: ¿QUÉ SON?

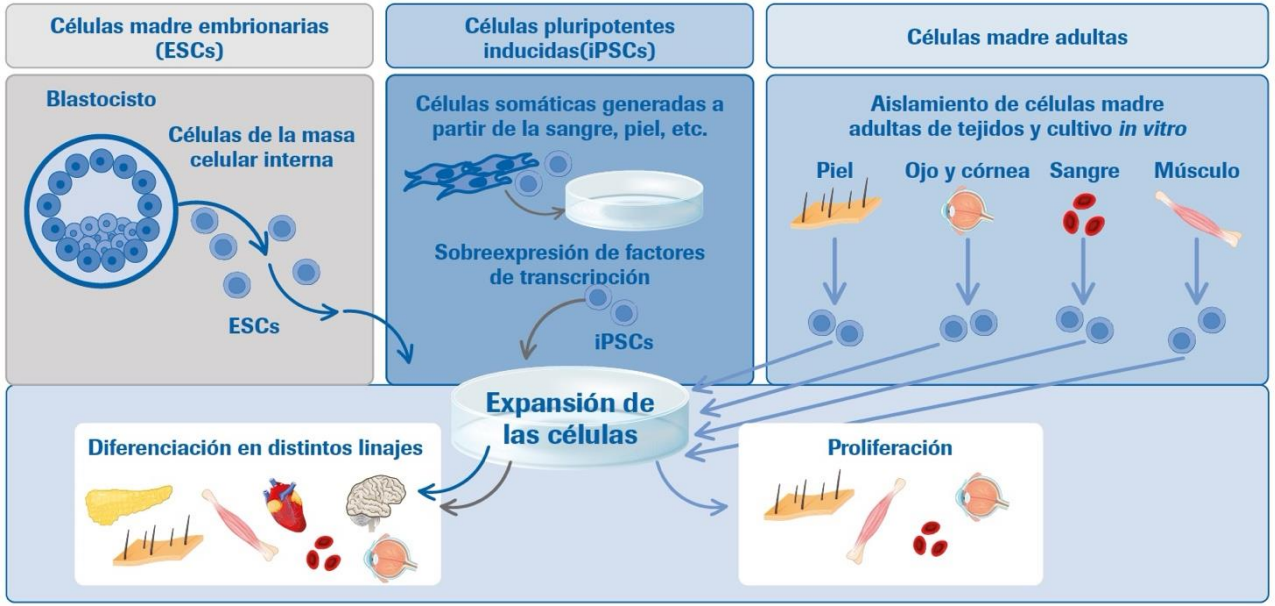
Células que son
- Autorrenovables
- Capaces de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados

Células madre: Tienen la capacidad de multiplicarse indefinidamente y generar células especializadas.
Células madre totipotentes: Son capaces de transformarse en cualquiera de los tejidos de un organismo. Cualquier célula totipotente colocada en el útero de una mujer tiene capacidad de originar un feto y un nuevo individuo.
Células madre pluripotentes: Capaces de producir la mayor parte de los tejidos de un organismo. Aunque pueden producir cualquier tipo de célula del organismo, no pueden generar un embrión.
Células madre multipotentes: Se encuentran en los individuos adultos. Pueden generar células especializadas concretas, pero se ha demostrado que pueden producir otro tipo diferente de tejidos.



TERAPIA CELULAR

CÉLULAS MADRE: TIPOS



Tipos de células madre según su lugar de origen:

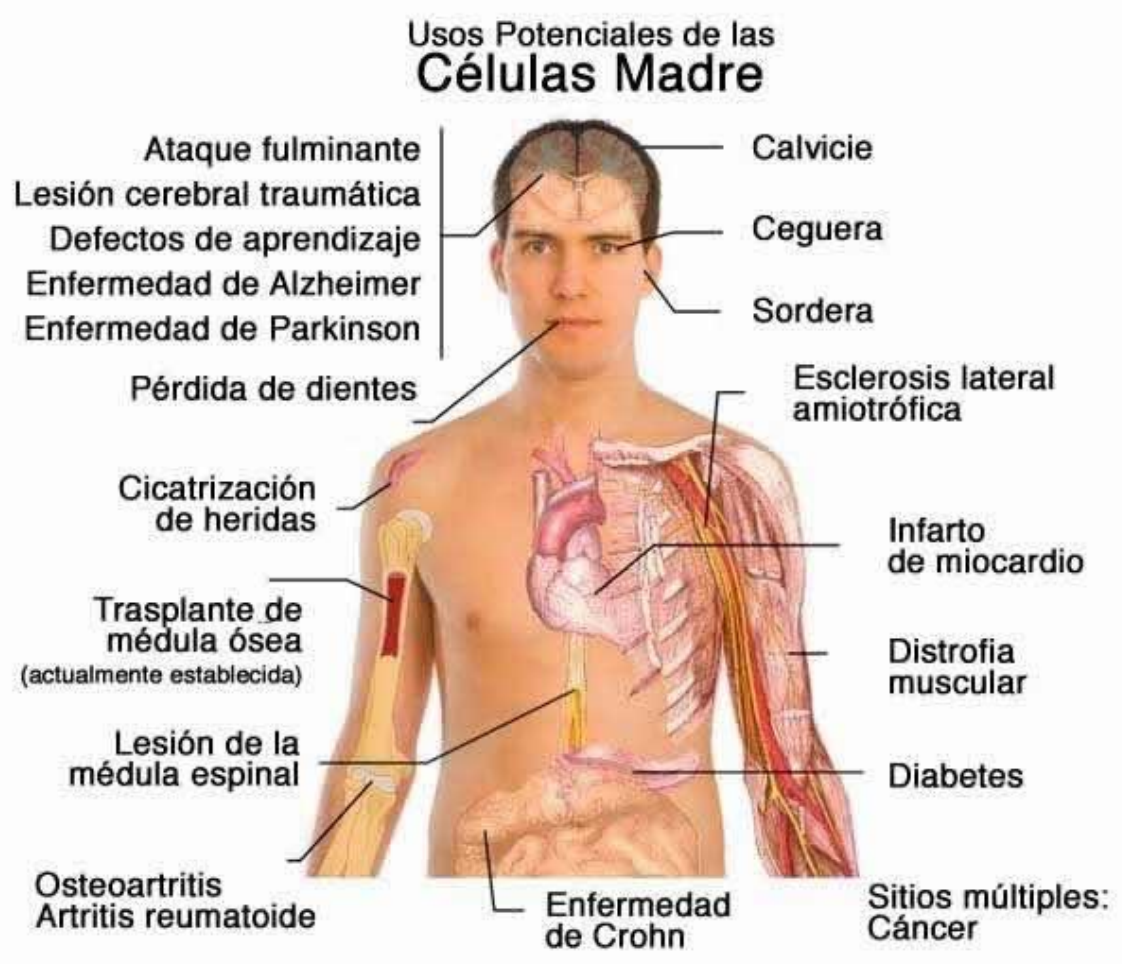
- **Células madre embrionarias (ESC):** proceden de las células de la masa celular interna del blastocisto, una de las etapas tempranas del desarrollo embrionario.
- **Células madre pluripotentes inducidas (iPSC):** son células madre con características pluripotenciales derivadas artificialmente de una célula que inicialmente no era pluripotencial.
- **Células madre adultas**: Células multipotentes que encuentran en pequeñas cantidades en la mayoría de los tejidos adultos, como la médula ósea o la grasa.

TERAPIA CELULAR

CÉLULAS MADRE: USOS POTENCIALES

Las terapias basadas en células madre se definen como cualquier tratamiento para una enfermedad o condición médica que implica fundamentalmente el **uso de cualquier tipo de células madre humanas viables**, incluidas:

- Células madre embrionarias (ESCs).
- Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).
- Células madre adultas para terapias autólogas (del mismo organismo) y alogénicas (el trasplante procede de otro organismo distinto al que lo recibe).



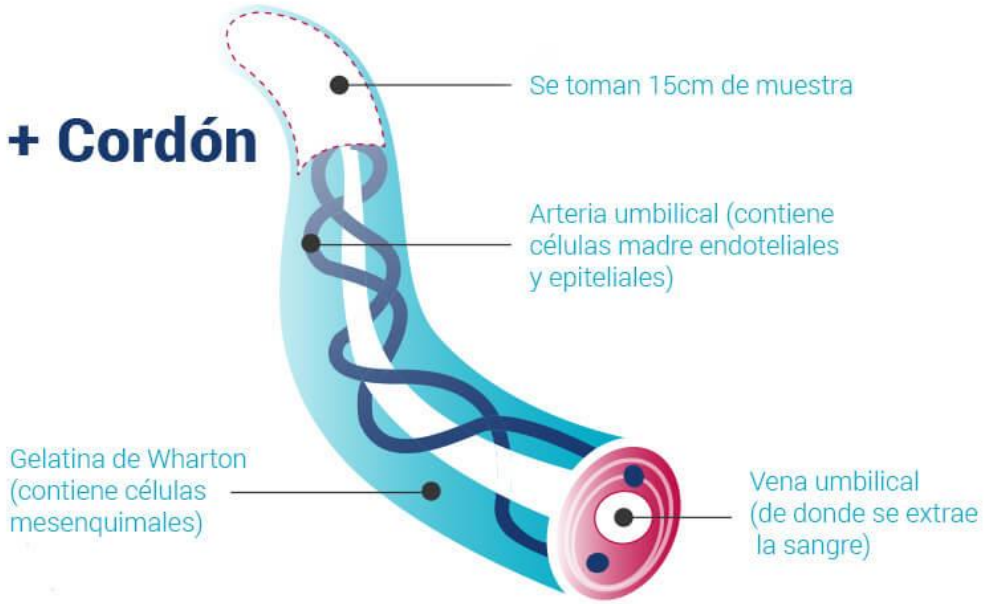
TERAPIA CELULAR

CÉLULAS MADRE: USO ACTUAL

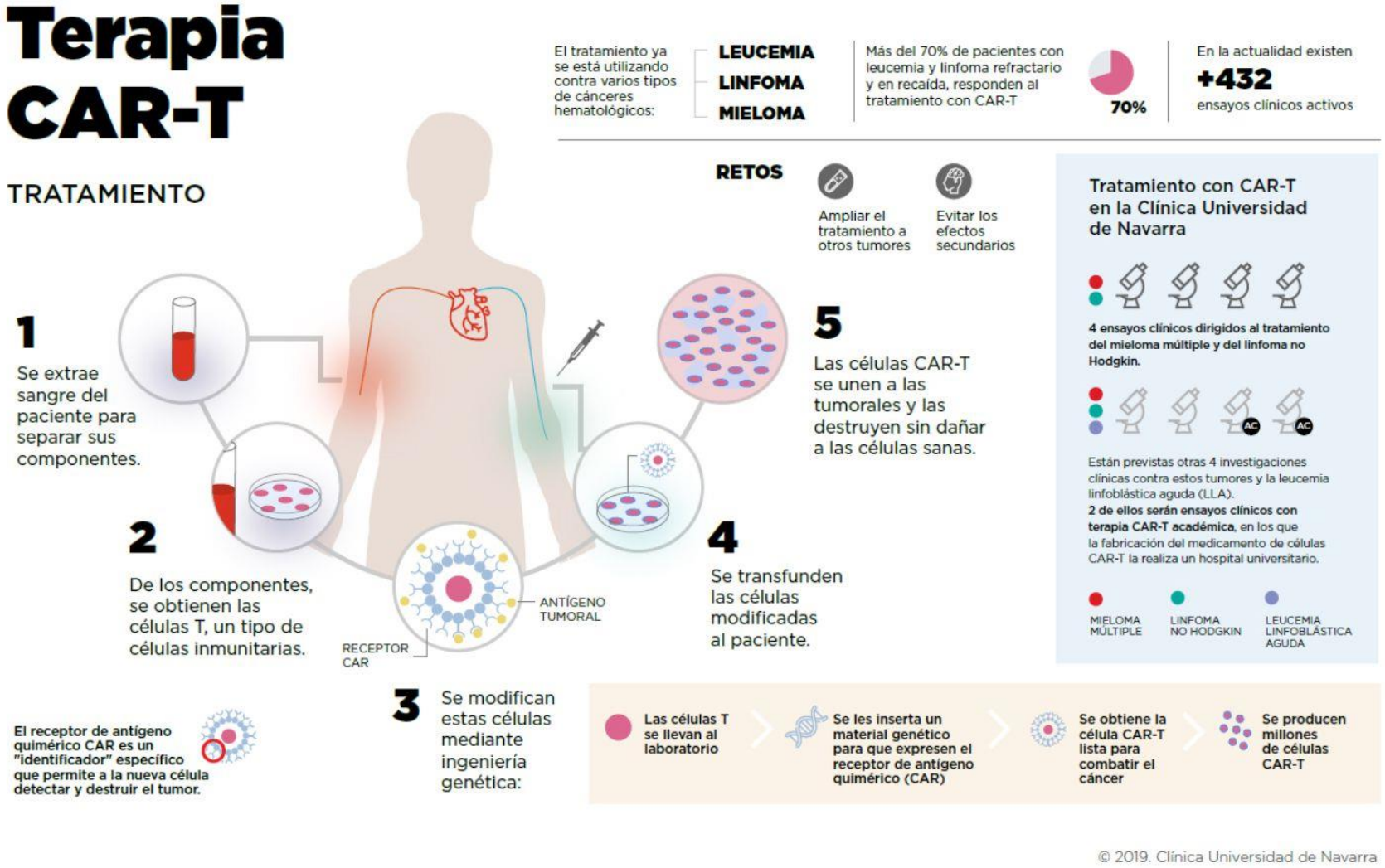
El tratamiento con células madre más establecido es el trasplante de médula ósea para tratar trastornos de la sangre y del sistema inmunitario ya que es la fuente principal de obtención de células madre, específicamente células madre hematopoyéticas (CMH), responsables de la producción de todos los tipos celulares sanguíneos.

La médula ósea no es la única fuente de obtención de CMH, recientemente el **cordón umbilical** se ha convertido en una fuente de gran relevancia para la obtención de células madre, implicando menos problemas quirúrgicos en su obtención, a diferencia de las proporcionadas por la médula ósea.

Desde los años 80, se han utilizado **células madre de la piel** para el crecimiento de injertos de piel en pacientes con quemaduras corporales graves o muy extensas.



TERAPIA MIXTA GÉNICA CELULAR



- Se alteran los genes dentro de las células T para que reconozcan antígenos específicos de células tumorales.
- Actualmente se están empleando para tratar ciertos cánceres como linfomas y leucemias.
- Se pueden combinar con técnicas como CRISPR/Cas.
- Estudios recientes usando nanotecnología y técnicas basadas en el ARNm permiten crear las células CAR-T dentro del cuerpo (*in vivo*).

TERAPIA MIXTA GÉNICA CELULAR

TERAPIA CAR-T

FDA-Approved CAR T-Cell Therapies

Generic Name	Brand Name	Target Antigen	Targeted Disease	Patient Population
Tisagenlecleucel	Kymriah	CD19	B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Children and young adults with refractory or relapsed B-cell ALL
			B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta	CD19	B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
			Follicular lymphoma	Adults with relapsed or refractory follicular lymphoma
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus	CD19	Mantle cell lymphoma (MCL)	Adults with relapsed or refractory MCL
			B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Adults with refractory or relapsed B-cell ALL
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	CD19	B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
Idecabtagene vicleucel	Abecma	BCMA	Multiple myeloma	Adults with relapsed or refractory multiple myeloma
Ciltacabtagene autoleucel	Carvykti	BCMA	Multiple myeloma	Adults with relapsed or refractory multiple myeloma

Posibles efectos secundarios que hay que controlar…

- Síndrome de tormenta de citocinas (STC).
- Efectos neurológicos: confusión, convulsiones y trastornos del habla (síndrome de neurotoxicidad asociado a células inmunitarias).

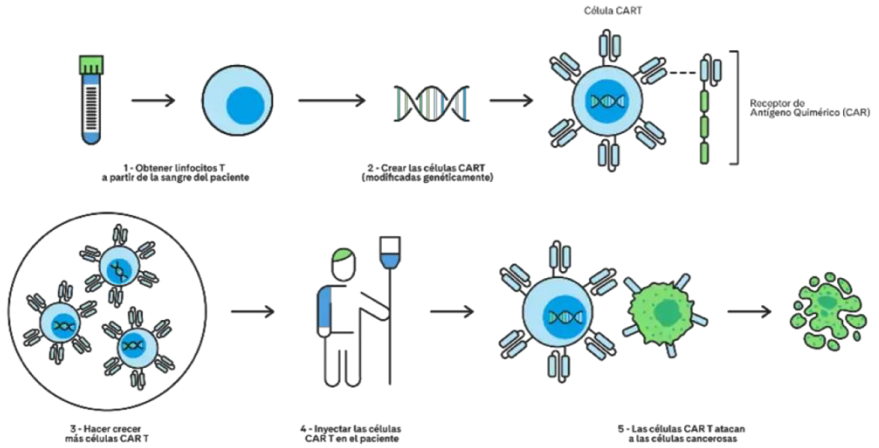
INVESTIGACIÓN

19 de julio del 2024

Luz verde al CAR-T ARI0002h desarrollado por el Clínic-IDIBAPS para pacientes con mieloma múltiple

El Comité de Evaluación de Medicamentos de uso humano de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) ha dado el visto bueno al ARI0002h para su aprobación como medicamento de terapia avanzada de fabricación no industrial en pacientes con mieloma múltiple resistentes a tratamientos convencionales.

Terapia celular CART

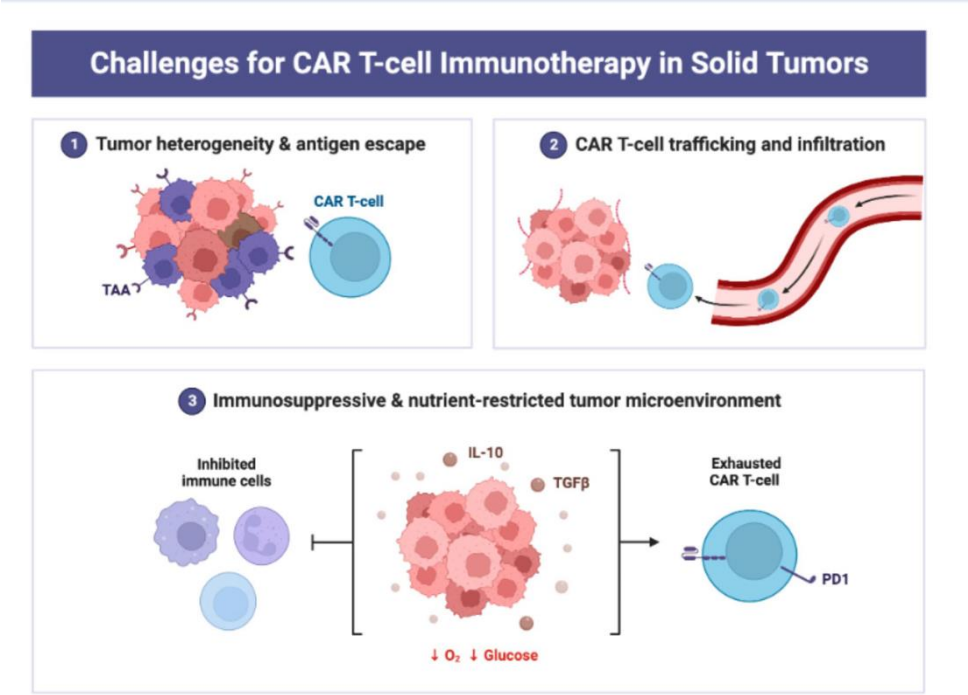


TERAPIA MIXTA GÉNICA CELULAR

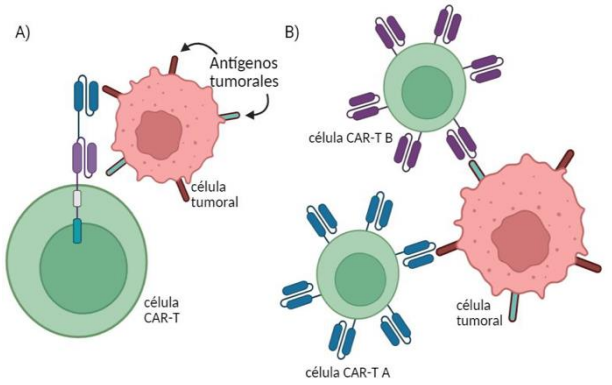
TERAPIA CAR-T

CAR-T en tumores sólidos

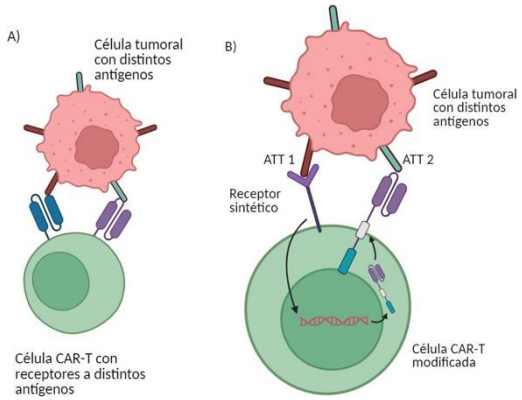
- ➜ Todos ellos en fase de ensayos clínicos, en distintos estadios.
- ➜ Actualmente se están haciendo ensayos para el tratamiento de: Glioblastomas, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón.
- ➜ La aplicación de esta inmunoterapia en tumores sólidos es un reto debido a limitaciones que limitan su eficacia: escape de antígenos, los efectos fuera del tumor sobre el objetivo, la dificultad del tráfico de las células CAR-T hacia el tumor (penetrabilidad e infiltración en el tejido), el microambiente inmunosupresor y las toxicidades asociadas a la terapia.



Marei et al., 2025 *Cancer Cell International*



Estrategias de multiplexación antigénica



Estrategias para superar la toxicidad *on-target off-tumor*

Información adaptada del TFG "Reprogramando el sistema inmunitario: Terapia CAR-T en la lucha contra los tumores sólidos" 2025 de Maria Àngels Santainés

¿Qué deberíamos saber al acabar este tema?

- Describir las técnicas moleculares más empleadas en la actualidad para diagnosticar enfermedades.
- Conocer el objetivo de cada técnica diagnóstica y comprender por qué se utiliza en esa ocasión.
- Explicar los distintos enfoques terapéuticos y discernir cual es el adecuado en función a la patología a tratar.
- Definir “terapia génica” y “células madre”, explicar su uso actual y conocer otros enfoques terapéuticos más vanguardistas.